

# 基于 Nrf2/ARE 信号通路探讨清热化痰方对大鼠 脑缺血再灌注损伤氧化应激反应的影响

胡跃强<sup>1\*</sup>, 秦红玲<sup>1</sup>, 唐农<sup>2</sup>, 李媛媛<sup>2</sup>, 王启芝<sup>2</sup>, 廖泰荣<sup>2</sup>

(1. 广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023; 2. 广西中医药大学, 南宁 530001)

**[摘要]** 目的:从核转录因子 E2 相关因子 2/抗氧化反应元件(Nrf2/ARE)信号通路探讨清热化痰方对脑缺血再灌注损伤大鼠氧化应激的影响及可能的作用机制。方法:采用 Longa 线栓法制备局灶性脑缺血再灌注大鼠(MCAO)模型,将 160 只 SD 大鼠随机分为 4 组,分别为假手术组(SO),模型组(MCAO),清开灵组(QKL),清热化痰方组(QRHY)。每组大鼠 40 只,根据取材时间点 12 h,1 d,2 d,3 d 可以分为每组分为 4 个亚组,每个亚组 10 只大鼠。分别采用氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法测量脑梗死体积,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和免疫组化检测 Nrf2/ARE 信号通路蛋白 Nrf2 和血红素加氧酶 1(HO-1) mRNA 及其蛋白表达变化。结果:与 SO 组比较,大鼠脑缺血再灌注后 1 d,MCAO 组梗死体积显著升高( $P < 0.01$ ),QKL 组较 MCAO 组梗死体积明显减小( $P < 0.05$ );QRHY 组脑梗死体积较 QKL 组进一步缩小( $P < 0.05$ );MCAO 组 Nrf2 和 HO-1 mRNA 及其蛋白表达均于缺血再灌注后 12 h 开始明显上升,24 h 达高峰( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ ),随再灌注时间延长其表达逐渐下降,但仍保持较高表达水平( $P < 0.05$ );QKL 组较 MCAO 组 Nrf2 和 HO-1 mRNA 及其蛋白表达明显升高( $P < 0.05$ ),QRHY 组较 QKL 组进一步升高 Nrf2 和 HO-1 mRNA 及其蛋白表达( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ )。结论:清热化痰方治疗脑缺血再灌注损伤可能通过激活 Nrf2/ARE 信号通路而降低细胞氧化损伤的程度,从而达到保护神经元的作用。

**[关键词]** 清热化痰方;脑缺血再灌注损伤;核转录因子 E2 相关因子 2/抗氧化反应元件

**[中图分类号]** R22;R24;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)14-0128-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181329

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180412.1057.016.html>

**[网络出版时间]** 2018-04-12 17:14

## Qingre Huayu Prescription Reduces Oxidative Stress in Rats with Cerebral Ischemia-reperfusion Injury Through Activating Nrf2/ARE Signaling Pathway

HU Yue-qiang<sup>1\*</sup>, QIN Hong-ling<sup>1</sup>, TANG Nong<sup>2</sup>, LI Yuan-yuan<sup>2</sup>,  
WANG Qi-zhi<sup>2</sup>, LIAO Tai-rong<sup>2</sup>

(1. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanning 530023, China; 2. Guangxi University of TCM, Nanning 530001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect and possible mechanism of Qingre Huayu prescription on oxidative stress in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury (I/R) through nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/antioxidant response element (ARE) pathway. **Method:** The focal cerebral ischemia rat (MCAO) model was prepared by suture method, and 160 SD rats were randomly divided into 4 groups: sham operation group (SO), model group (MCAO), Qingkailing control group (QKL), and Qingre Huayu prescription group (QRHY),  $n = 40$  in each group. Each group was further divided into 4 subgroups according to 12 h, 1 d, 2 d and 3 d after I/R,  $n = 10$  in each sub group. Cerebral infarction volume was tested by triphenyltetrazolium chlorid (TTC) staining method, and the changes of the mRNA and protein expression of Nrf2 and heme oxygenase

**[收稿日期]** 20180101(008)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81560759);国家自然科学基金青年项目(81704034)

**[通信作者]** \* 胡跃强,博士,教授,从事缺血性脑血管病中医药防治工作,E-mail: 137463195@qq.com

1 (HO-1) at each time point after reperfusion were observed by real-time fluorescence quantitative PCR (Real-time PCR) and immunohistochemistry separately. **Result:** As compared with the normal group, the brain infarct volume was significantly increased in MCAO group 1 d after cerebral ischemia reperfusion ( $P < 0.01$ ); the brain infarct volume in QKL group was significantly smaller than that of MCAO group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); QRHY could further decrease the brain infarct volume as compared with QKL group ( $P < 0.05$ ). The mRNA and protein expression levels of Nrf2 and HO-1 in MCAO group were increased significantly 12 h after I/R, and reached the peak at 24 h ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), then decreased continuously with the increase of I/R time, but still maintained high expression levels ( $P < 0.05$ ). QKL could increase the mRNA and protein expression levels of Nrf2 and HO-1 as compared with MCAO group ( $P < 0.05$ ). QRHY could further increase the above expression as compared with QKL group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** QRHY may up-regulate the expressions of Nrf2 and HO-1 in rats and relieve I/R through activating the Nrf2/ARE signaling pathway.

[**Key words**] Qingre Huayu prescription; cerebral ischemia reperfusion; nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) /antioxidant response element (ARE)

针对目前缺血性中风治疗发展的局限,中医药单方、复方、针剂等在治疗缺血性中风方面近年来也取得了一定成效。中风病之“毒邪”和“络病”理论提出后,采用清热解毒和活血化瘀相结合的方法治疗中风病逐渐受到人们的关注。王永炎院士提出“毒损脑络”的新观点<sup>[1]</sup>。王行宽指出脑络所中之毒,以火毒、热毒为主,缺血性中风以热毒常见<sup>[2]</sup>。周仲瑛认为“瘀热阻窍”为中风病急性期的中心病机,瘀血与火热相搏是重要的发病因素<sup>[3]</sup>。近年来清热化瘀法治疗缺血性中风作为新的方向,受到很多学者的关注。

笔者认为中风病的病机核心是气血逆乱。主要是依据“毒邪”与“络病”的治病机制,缘于痰毒、瘀毒、热毒互为胶着,瘀致于脑络所引起的急性脑损伤,依据这一病机治疗是改善各种临床症状及预后的重要策略<sup>[4]</sup>。针对以上病机,笔者提出“清热解毒,化瘀通络”的治法(简称清热化瘀法),解毒以对抗损害因素是为祛邪,通络以畅行气血是为扶正,并在此基础上组建了清热化瘀方。前期研究证实其可以显著减轻缺血再灌注损伤,减轻内质网应激反应,减少神经元凋亡,具有良好的神经保护作用<sup>[5-7]</sup>。

氧化应激(oxidative stress, OS)是脑缺血再灌注损伤(ischemia/reperfusion, I/R)的核心环节之一<sup>[8-10]</sup>,目前研究表明 Keap1-核转录因子 E2 相关因子 2/抗氧化反应元件(Nrf2/ARE)系统是机体内最重要的抗氧化应激系统<sup>[11]</sup>。负调节 Nrf2 是一个可调节大量抗氧化蛋白基因表达的转录因子,血红素加氧酶-1(HO-1)是该通路上下游的关键靶蛋白,已有的研究表明其在多个脏器缺血再灌注损伤中表达增加<sup>[12-13]</sup>,但二者在脑缺血损伤后的表达规律不

明。基于“毒邪”和“络病”而设的清热化瘀方是治疗脑梗死急性期有确切效果的中药复方制剂经验方<sup>[14]</sup>,前期研究表明它有抗内质网应激的作用,而 OS 是内质网应激的前体条件,因此笔者提出假设,清热化瘀方可能通过抗氧化应激反应发挥神经保护作用。本研究以清热化瘀方作为干预方法,以探讨其对 Nrf2 和 HO-1 表达的影响,探讨该方对脑 I/R 损伤的神经保护机制,以期为临床治疗脑梗死提供理论依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 160 只,体重(250 ± 50)g,由湖南斯莱克动物实验公司提供,生产合格证号 SCXK(湘)2016-0002。实验方案通过广西中医药大学伦理委员会批准(伦审[2015]-024)。

**1.2 药物及试剂** 清热化瘀方(水牛角 30 g,丹参 15 g,赤芍 15 g,地龙 10 g,石菖蒲 10 g,川芎 10 g,郁金 10 g,酒大黄 6 g,天竺黄 10 g 等组成)单味中药浓缩颗粒剂,购自江苏省江阴市江阴天江药业有限公司,批号 0904099,所有药材均由广西中医药大学第一附属医院杨正腾副主任药师鉴定均为正品,符合 2015 年版《中国药典》规范;清开灵颗粒(哈尔滨一洲制药有限公司,国药准字 Z10930010);总 RNA 提取试剂盒 trizol 试剂(北京天根生化科技有限公司,批号 15596026);PCR 反应试剂盒及逆转录试剂盒(日本 Takara 公司,批号 BK5043);小鼠抗大鼠 Nrf2 及 HO-1 单克隆抗体(美国 Abcam 公司,批号分别为 GR164327-4, 153465-10);偶联有辣根过氧化物(HRP)羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G 二抗(北京中杉金桥有限公司,批号 151868);DAB 显色(武汉博

士德生物工程公司,批号 152955);引物及内参均由桂林恒顺公司合成。

**1.3 仪器** RM2235 型石蜡切片机(德国 Leica 公司);CX41-32C02 型光学显微镜(日本 Olympus 公司);5331 型 PCR 扩增仪(德国 Eppendorf 公司);D810 型数码相机(日本 Nikon 公司)。

## 2 方法

**2.1 分组及给药** 随机将大鼠分为 4 组,分别为假手术组(sham-operation, SO),模型组(MCAO),清热化痰颗粒组(QRHY),清开灵颗粒组(QKL),每组 40 只。因缺血早期(3~6 h 内)可使用溶栓治疗可以重建缺血区血供,减少脑损伤,改善预后。而本研究旨在研究再灌注损伤,故选择每组按照再灌注后 12 h,1 d,2 d,3 d 4 个时间点平均分为 4 个亚组( $n=10$ )。SO 组以假手术代替缺血再灌注,线栓只插入颈内动脉 9 mm;MCAO 组动物行 MCAO 2 h,造模后正常饲养,灌胃等体积的生理盐水,再灌注后规定时间点处死;QRHY 组在制作模型前 30 min 予以清热化痰颗粒溶液灌胃( $14 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),在大鼠造模麻醉清醒后 1 h 继予该颗粒灌胃,连续 3 d,每天上、下午各 1 次,再灌注后规定时间点处死;QKL 组在制作模型前 30 min 予以清开灵颗粒溶液灌胃( $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),在大鼠造模麻醉清醒后 1 h 继予该颗粒灌胃,连续 3 d,每天上、下午各 1 次,再灌注后规定时间点处死;灌胃液体量为每次  $14 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  大鼠,其浓度及等效剂量按人和动物间体表面积比值折算。

**2.2 动物模型制备** 参照 Longa 等<sup>[15]</sup>线栓法制备大鼠脑梗死再灌注模型。腹腔注射 10% 水合氯醛( $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ )对大鼠进行麻醉,在颈部正中纵向切开皮肤,钝性分离颈部皮下腺体及组织。分离右侧颈总动脉(CCA),在 CCA 近心端穿线,向头部分离,从 CCA 分叉处向上分离颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA)。结扎 CCA 近心端及 ECA 近心端。在 CCA 残端下备线,用小型动脉夹暂时夹闭 ICA。用眼科剪在 CCA 残端剪一小口,将 CCA 残端的结扎线牵拉,使 CCA 残端与 ICA 方向一致,然后插入线栓的球端使其进入 ICA,线栓球端进入 2 cm 左右,并用备线适度结扎;缝合颈部皮肤,2 h 后把线栓拔出制作脑缺血再灌注损伤。后再按各随机分组的处理方法饲养大鼠,在 4 个不同时间点处死大鼠。

**2.3 氯化三苯基四氮唑(TTC)染色大鼠脑组织** 随机选择再灌注后 1 d 各亚组 4 只大鼠,神经功能障碍评分后麻醉,4% 多聚甲醛灌注后断头处死,速取出新鲜脑组织,于  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中冻 20 min,由前

向后冠状切面,约 2 mm 厚度,共 5 片,放入 2% TTC 溶液中避光,37  $^\circ\text{C}$  电热恒温染色 30 min,2 h 后将脑片用数码相机拍照,用 Photoshop 图像分析法进行计算。梗死体积计算方法为测量各层面脑梗死的面积,根据公式  $V = t(A_1 + \dots + A_n)$  计算脑梗死体积,其中  $t$  为脑片厚度, $A_1 \dots A_n$  为各剖面面积。脑梗死体积/全脑体积作为统计参数。

**2.4 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 Nrf2 及 HO-1 mRNA 表达变化** 参考试剂盒说明书提取总 mRNA。比较两基因扩增效率选取 cDNA 样品模板进行 5 倍梯度稀释,进行 Real-time PCR 反应,得出荧光曲线,通过 cDNA 浓度梯度的 log 值对  $\Delta C_t$  值作图比较两基因扩增效率。总 mRNA 蛋白抽提,参考总 RNA 提取试剂盒,按说明书进行提取。Nrf2 引物序列为上游 5'-ATATTCCCAGCCACGTTGAG-3';下游 5'-AACTTGCTCCATGTCCTGCT-3',扩增长度 320 bp;HO-1 引物序列为上游 5'-AAGAGGCTAAGACCGCCTTC-3';下游 5'-CCTCTGGCGAAGAACTCTG-3',扩增长度 216 bp; $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)引物序列为上游 5'-TGTCACCAACTGGGACGATA-3';下游 5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAA-3',扩增长度 400 bp。反转录,取 PCR 管,加入含 RNA 2  $\mu\text{g}$  的溶液;加入 oligo(dT) 15 1  $\mu\text{L}$ ;依次加入 5  $\times$  buffer 4  $\mu\text{L}$ , 10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTPs 2  $\mu\text{L}$ ,RNA inhibitor 1  $\mu\text{L}$  和反转录酶 1  $\mu\text{L}$ ,混匀;于 PCR 仪上 42  $^\circ\text{C}$  保温 60 min,结束后 80  $^\circ\text{C}$  保温 5 min 灭活反转录酶。PCR 扩增 94  $^\circ\text{C}$  预变性 30 s;40 个循环,95  $^\circ\text{C}$  5 s,60  $^\circ\text{C}$  30 s,溶解曲线 60  $^\circ\text{C}$ ,95.1  $^\circ\text{C}$ ,每 20 s 升温 0.3  $^\circ\text{C}$ 。 $\Delta\Delta C_t$  法, $A = C_t$ (目的基因,待测样本) -  $C_t$ (内标基因,待测样本), $B = C_t$ (目的基因,对照样本) -  $C_t$ (内标基因,对照样本), $K = A - B$ ,表达倍数 =  $2 - K$ 。 $\Delta C_t$  值与 mRNA 表达量成反比,即  $\Delta C_t$  值越小,表明 mRNA 表达量越多。

**2.5 免疫组化检测 Nrf2 及 HO-1 表达** 石蜡切片先以脱蜡,用柠檬酸高压抗原修复,以 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  灭活内源性过氧化物酶,接着分别滴加 1:100 稀释的小鼠抗大鼠 Nrf 及 HO-1 单克隆抗体,4  $^\circ\text{C}$  过夜,然后以磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤。再滴加二抗,PBS 冲洗,DAB 显色 7 min,苏木素染色,脱水,中性树脂封片。利用 Image Proplus 6.0(media Cybernetics)软件检测每张图片的平均积分吸光度 IA。

**2.6 统计学分析** 采用 SPSS 22.0 统计软件包处理,成组设计多样本均数的比较用单因素方差分析,

剂量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示,多样本均数与同组均数间的比较用 LDS-*t* 检验,检验水准  $\alpha = 0.05$ ,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 I/R 大鼠脑梗死体积的影响** TTC 染色后显示,SO 组无梗死灶,MCAO 组有显著梗死灶 ( $P < 0.01$ );QKL 组梗死体积明显小于 MCAO 组 ( $P < 0.05$ ),QRHY 组梗死体积明显小于 QKL 组,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1,图 1。

表 1 清热化痰方对 I/R 大鼠脑梗死体积的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 1 Effect of Qingre Huayu prescription on cerebral infarction volume in I/R rats ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	脑梗死体积/mm <sup>3</sup>
SO	-	0
MCAO	-	5.97 ± 0.07 <sup>1)</sup>
QKL	20	5.53 ± 0.09 <sup>2)</sup>
QRHY	14	4.84 ± 0.06 <sup>3,4)</sup>

注:与 SO 组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与 MCAO 组同时时间点比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ;与 QKL 组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$ 。

**3.2 对 I/R 大鼠 Nrf2, HO-1 mRNA 表达的影响** 与 SO 组比较,MCAO 组大鼠脑缺血再灌注缺血半

表 2 清热化痰方对 I/R 大鼠 Nrf2 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 2 Effect of Qingre Huayu prescription on Nrf2 mRNA expression in I/R rats ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	12 h	1 d	2 d	3 d
SO	-	1.367 ± 0.621	1.340 ± 0.748	1.323 ± 0.654	1.330 ± 0.759
MCAO	-	1.160 ± 0.594 <sup>1)</sup>	1.023 ± 0.501 <sup>2)</sup>	1.163 ± 0.544 <sup>1)</sup>	1.180 ± 0.569 <sup>1)</sup>
QKL	20	0.913 ± 0.410 <sup>3)</sup>	0.737 ± 0.330 <sup>3)</sup>	0.887 ± 0.474 <sup>3)</sup>	0.975 ± 0.312 <sup>3)</sup>
QRHY	14	0.790 ± 0.301 <sup>4)</sup>	0.580 ± 0.346 <sup>4)</sup>	0.700 ± 0.300 <sup>4)</sup>	0.840 ± 0.352 <sup>4)</sup>

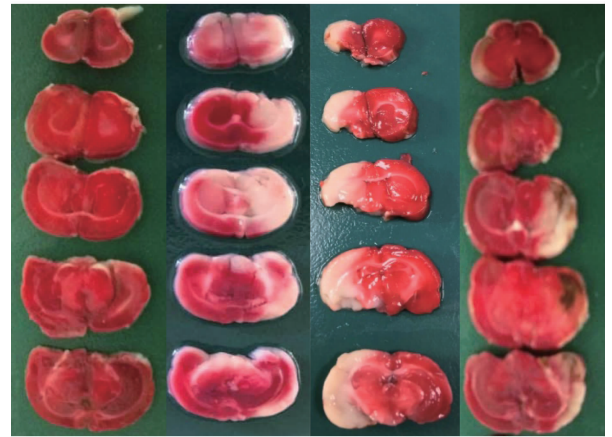
注:与 SO 组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与 MCAO 组同时时间点比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ;与 QKL 组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>5)</sup>  $P < 0.01$ (表 3~5 同)。

表 3 清热化痰方对 I/R 大鼠 HO-1 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 3 Effect of Qingre Huayu prescription on HO-1 mRNA expression in I/R rats ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	12 h	1 d	2 d	3 d
SO	-	1.912 ± 0.914	2.060 ± 1.122	1.923 ± 0.854	1.930 ± 0.959
MCAO	-	1.533 ± 0.697 <sup>2)</sup>	1.323 ± 0.550 <sup>2)</sup>	1.565 ± 0.546 <sup>2)</sup>	1.664 ± 0.608 <sup>1)</sup>
QKL	20	1.327 ± 0.539 <sup>3)</sup>	1.126 ± 0.534 <sup>3)</sup>	1.377 ± 0.532 <sup>3)</sup>	1.409 ± 0.572 <sup>3)</sup>
QRHY	14	1.085 ± 0.447 <sup>4)</sup>	0.895 ± 0.368 <sup>5)</sup>	1.102 ± 0.453 <sup>4)</sup>	1.206 ± 0.425 <sup>4)</sup>

**3.3 对 I/R 大鼠 Nrf2 蛋白表达的影响** 与 SO 组比较,MCAO 组大鼠脑缺血再灌注 12 h 缺血半暗带 Nrf2,HO-1 蛋白开始升高,1 d 表达达到高峰 ( $P < 0.01$ ),随再灌注时间延长其表达逐渐下降,但仍保持较高表达水平 ( $P < 0.05$ );QKL 组缺血各时间点



A. SO 组;B. MCAO 组;C. QKL 组;D. QRHY 组(图 2,3 同)

图 1 清热化痰方对大鼠脑梗死体积的影响 (TTC)

Fig.1 Effect of Qingre Huayu prescription on cerebral infarction volume at 1 d time point (TTC)

暗带 Nrf2,HO-1 mRNA 表达 1 d 到达高峰 ( $P < 0.01$ ),随再灌注时间延长其表达逐渐下降,但 3 d 时仍保持较高表达水平 ( $P < 0.05$ );QKL 组缺血各时间点其表达水平较 MCAO 组均明显升高 ( $P < 0.05$ );QRHY 组较 QKL 组各时间点其表达水平进一步升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 2,3。

其表达水平较 MCAO 组均明显升高 ( $P < 0.05$ );QRHY 组较 QKL 组各时间点其表达水平进一步升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 4,5,图 2,3。

### 4 讨论

Nrf2/ARE 是机体抵抗内外界氧化和化学等刺

表 4 清热化痰方对 I/R 大鼠 Nrf2 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 4 Effect of Qingre Huayu prescription on Nrf2 protein expression in I/R rats ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	12 h	1 d	2 d	3 d
SO	-	0.32 ± 0.05	0.33 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.30 ± 0.04
MCAO	-	0.42 ± 0.03 <sup>1)</sup>	0.48 ± 0.04 <sup>2)</sup>	0.46 ± 0.05 <sup>1)</sup>	0.44 ± 0.03 <sup>1)</sup>
QKL	20	0.45 ± 0.03 <sup>3)</sup>	0.52 ± 0.03 <sup>3)</sup>	0.49 ± 0.05 <sup>3)</sup>	0.47 ± 0.04 <sup>3)</sup>
QRHY	14	0.49 ± 0.03 <sup>4)</sup>	0.55 ± 0.02 <sup>4)</sup>	0.52 ± 0.03 <sup>4)</sup>	0.51 ± 0.02 <sup>4)</sup>

表 5 清热化痰方对 I/R 大鼠 HO-1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 5 Effect of Qingre Huayu prescription on HO-1 protein expression in I/R rats ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	12 h	1 d	2 d	3 d
SO	-	0.55 ± 0.08	0.53 ± 0.07	0.50 ± 0.06	0.60 ± 0.07
MCAO	-	0.84 ± 0.13 <sup>1)</sup>	0.98 ± 0.17 <sup>2)</sup>	0.86 ± 0.15 <sup>2)</sup>	0.82 ± 0.14 <sup>1)</sup>
QKL	20	1.03 ± 0.16 <sup>3)</sup>	1.25 ± 0.20 <sup>3)</sup>	1.10 ± 0.18 <sup>3)</sup>	0.99 ± 0.19 <sup>3)</sup>
QRHY	14	1.29 ± 0.21 <sup>4)</sup>	1.47 ± 0.25 <sup>4)</sup>	1.36 ± 0.23 <sup>4)</sup>	1.26 ± 0.22 <sup>4)</sup>

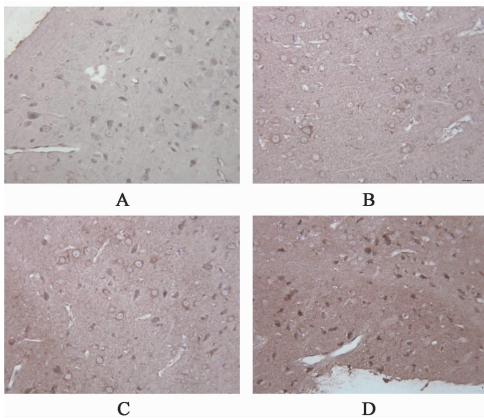


图 2 清热化痰方对 I/R 大鼠 1 d 时间点 Nrf2 蛋白表达的影响 (免疫组化, ×400)

Fig.2 Effect of Qingre Huayu prescription on expression of Nrf2 protein at 1 d time point in I/R rats (IHC, ×400)

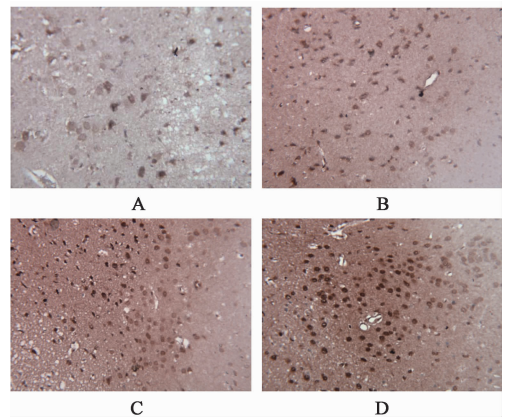


图 3 清热化痰方对 I/R 大鼠 1 d 时间点 HO-1 蛋白表达的影响 (免疫组化, ×400)

Fig.3 Effect of Qingre Huayu prescription on expression of HO-1 protein at 1 d time point in I/R rats (IHC, ×400)

激的防御性转导通路<sup>[12]</sup>,其作为内源性抗氧化应答机制信号通路之一在氧化应激中占有重要的地位<sup>[16]</sup>。在内外界自由基和化学物质刺激时,Nrf2 直接被磷酸化,导致 Nrf2 与 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Keap1)解离而活化。活化的 Nrf2 进入细胞核,与 ARE 结合,启动 ARE 下游的 II 相解毒酶、抗氧化蛋白、蛋白酶体/分子伴侣等基因转录和表达以抵抗内外界的有害刺激,诸如 HO-1 等细胞内氧化还原基因是 Nrf2/ARE 信号途径调节的主要内源性保护基因<sup>[17]</sup>。这些抗氧化蛋白可通过一系列协同作用清除过量的 ROS,对维持细胞正常的氧化还原状态、对抗氧化应激起重要作用<sup>[18]</sup>。研究显示,Nrf2/ARE 通路在心、脑、肝道等多个脏器中可均发挥内源性抗氧化作用<sup>[19]</sup>。如 YANG 等<sup>[20]</sup>通过给予大鼠

局部脑缺血模型注射 Nrf2 激动剂姜黄素,证实了其能够通过激活 Nrf2/ARE 通路发挥神经保护作用。因此,探讨其在脑 I/R 损伤过程中的作用,可为大脑 I/R 损伤提供一种新的治疗靶点和新思路。

本研究结果表明,脑缺血再灌注损伤后,Nrf2 及 HO-1 mRNA 及其蛋白表达于 12 h 开始明显增加,1 d 达到高峰,2 d 后开始下降。清热化痰方干预后其表达明显上调,且能降低脑梗死体积,其疗效优于 QKL,表明该方可能通过 Nrf2/ARE 途径发挥脑缺血损伤神经保护作用。

[参考文献]

[1] 常富业,王永炎.中风病毒邪论[J].北京中医药大学学报,2004,27(1):3-6.

- [ 2 ] 范金茹. 王行宽教授对缺血中风的论述与临证经验撷菁[J]. 中华中医药学刊, 2002, 20(11): 9-10.
- [ 3 ] 刘红权, 郭灵龙, 郭立中. 证机要素与中风病预警探析[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(11): 2168-2169.
- [ 4 ] 祝美珍, 胡国恒, 肖艳芬, 等. 淤痰热毒并治抗急性脑缺血损伤的策略探究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(2): 392-393.
- [ 5 ] 胡跃强, 唐农, 雷龙鸣, 等. 大鼠脑缺血预处理后PERK表达的变化及清热化痰方的干预研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(6): 1332-1334.
- [ 6 ] 胡跃强, 胡国恒, 吴云虎, 等. 清热化痰颗粒治疗急性脑梗死临床观察[J]. 辽宁中医杂志, 2004, 20(7): 65-67.
- [ 7 ] 胡跃强, 陈海峰, 甘业贤, 等. 缺氧预处理MSCs移植对脑缺血再灌注损伤大鼠SDF-1/CXCR4表达的影响及清热化痰方的干预作用[J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(6): 779-784.
- [ 8 ] Sanderson T H, Reynolds C A, Kumar R, et al. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation[J]. Mol Neurobiol, 2013, 7(1): 9-23.
- [ 9 ] Chouchani E T, Pell V R, Gaude E, et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS [J]. Nature, 2014, 15(7527): 431-435.
- [ 10 ] Ray P D, HUANG B W, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling [J]. Cell Signal, 2012, 24(5): 981-990.
- [ 11 ] 李珊珊, 陈忠云, 李婧, 等. Keap1/Nrf2/ARE信号通路在中枢神经系统疾病中的研究进展[J]. 中国全科医学, 2014, 17(30): 3641-3644.
- [ 12 ] Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism [J]. Trends Mol Med, 2004, 10(11): 549-557.
- [ 13 ] WANG A L, NIU Q, SHI N, et al. Glutamine ameliorates intestinal ischemia-reperfusion injury in rats by activating the Nrf2/ARE signaling pathway [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(7): 7896-7904.
- [ 14 ] 胡跃强, 兰鹏, 梁妮, 等. 清热化痰方治疗急性中风的临床疗效观察及其作用机制研究[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(10): 2105-2107.
- [ 15 ] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S. Reversible middle cerebral artery: occlusion without craniectomy in rat [J]. Stroke, 1989, 20: 84-91.
- [ 16 ] JIANG Y M, WANG Y, TAN H S, et al. Schisandrol B protects against acetaminophen-induced acute hepatotoxicity in mice via activation of the Nrf2/ARE signaling pathway [J]. Acta Pharmacol Sin, 2016, 37(3): 382-389.
- [ 17 ] XIA B, LIU H, XIE J, et al. Akt enhances nerve growth factor-induced axon growth via activating the Nrf2/ARE pathway [J]. Int J Mol Med, 2015, 36(5): 1426-1432.
- [ 18 ] XU X, ZHANG L, YE X, et al. Nrf2/ARE pathway inhibits ROS-induced NLRP3 inflammasome activation in BV2 cells after cerebral ischemia reperfusion [J]. Inflamm Res, 2017, doi:10.1007/s00011-017-1095-6.
- [ 19 ] CHI X J, ZHANG R, SHEN N, et al. Sulforaphane reduces apoptosis and oncosis along with protecting liver injury-induced ischemic reperfusion by activating the Nrf2/ARE pathway [J]. Hepatol Int, 2015, 9(2): 321-329.
- [ 20 ] YANG C, ZHANG X, FAN H, et al. Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia [J]. Brain Res, 2009, 1282(12): 133-141.

[责任编辑 周冰冰]